

**PENGARUH SENYAWA ASAM  
2-(4-KLORMETILBENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP  
AGREGASI TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN  
*THROMBOCYTE AGGREGATION TEST* DAN *IMMUNO-FLOW*  
*CYTOMETRY* PADA PLASMA MANUSIA**

**SKRIPSI**



**FEBRINA FATKIYAH JARRA**

**2443013324**

**PROGRAM STUDI S1  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA  
2018**

**PENGARUH SENYAWA ASAM  
2-(4-KLORMETILBENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP  
AGREGASI TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN  
*THROMBOCYTE AGGREGATION TEST* DAN *IMMUNO-FLOW*  
*CYTOMETRY* PADA PLASMA MANUSIA**

**SKRIPSI**

**Diajukan kepada  
Fakultas Farmasi Universitas Widya Mandala Surabaya untuk  
memenuhi sebagai persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi**



**FEBRINA FATKIYAH JARRA**

**2443013324**

**PROGRAM STUDI S1  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA  
2018**

**PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(4-  
(KLOROMETIL)BENZOILOKSE)BENZOAT TERHADAP  
AGREGASI TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN  
THROMBOCYTE AGGREGATION TEST DAN IMMUNO-FLOW  
CYTOMETRY PADA PLASMA MANUSIA**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan  
memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Strata I  
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

**OLEH :**

**FEBRINA FATKIYAH JARRA  
2443013324**

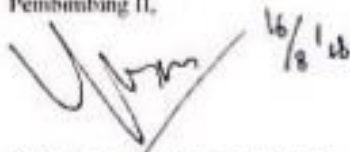
Telah disetujui pada tanggal 10 Agustus 2018 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing I,



Dr. Endang Retnowati, MS., Sp. PK. (K)  
NIK.242.LB.0075

Pembimbing II,

 16/8/18

Yudy Tjahjono, B.Sc., M.Sc.biol.  
NIK.241.15.0835

Mengetahui,  
Ketua penguji



Dra. Siti Sunghati, MS., Apt.  
NIK.244/12.0734

## LEMBAR PERNYATAAN KARYA ILMIAH NON PLAGIAT

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Surabaya, 10 Agustus 2018



Febrina Fatkiyah Jarra  
2443013324

**LEMBAR PERSETUJUAN  
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/ karya ilmiah saya dengan judul : **Pengaruh Senyawa Asam 2-(4-Klorometilbenzoidoksi)Benzoat terhadap Agregasi Trombosit dengan Metode Pengujian *Thrombocyte Aggregation Test* dan *Immuno-flow Cytometry* pada Plasma Manusia** untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Unika Widya Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 10 Agustus 2018



**ABSTRAK**  
**PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(4-(KLOROMETIL))**  
**BENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT**  
**DENGAN METODE PENGUJIAN *THROMBOCYTE AGGREGATION***  
***TEST* DAN IMMUNO *FLOW-CYTOMETRY* PADA PLASMA**  
**MANUSIA**

**FEBRINA FATKIYAH JARRA**  
**2443013324**

Asam asetilsalisilat merupakan obat populer analgesik dan anti-trombosit yang sering diminum secara per-oral. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji agregasi trombosit terhadap asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat menggunakan plasma manusia dengan metode *thrombocyte aggregation test* (TAT) dan *Immuno-flow cytometry*. Diharapkan data yang diperoleh dapat digunakan untuk pengembangan senyawa baru yang lebih efektif dan kurang toksik jika dibandingkan dengan aspirin. Pada penelitian ini menggunakan plasma manusia melalui lengan pasien yang diberikan beberapa perlakuan secara *in vitro* yaitu kelompok kontrol negatif (Hepes 50 mM), kontrol positif (Asam asetilsalisilat+Hepes 50 mM) dan senyawa uji (asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat+Hepes 50 mM). Pada metode ini menggunakan konsentrasi sebesar 50µg/ml (277 µM). Perlakuan menggunakan PRP yang nantinya diberi beberapa perlakuan. Pada *Immuno-Flow Cytometry* meliputi uji reaktivitas dan uji agregasi trombosit. Uji *immuno-flow cytometry* menggunakan antibodi PE anti *human* AP-3 dan Alexa Flour 488 anti *human* AP-3. Pada kedua metode uji agregasi trombosit ditambahkan agonis berupa kolagen. Hasil uji TAT diperoleh rata-rata (vmax) pada kelompok kontrol negatif adalah  $(0.367 \pm 0.061\%$  detik), kontrol positif  $(0.179 \pm 0.062\%$  detik) dan senyawa uji (Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan Hepes 50 mM)  $(0.311 \pm 0.031\%$  detik). Hasil uji *Immuno-Flow Cytometry* diperoleh rata-rata %total (*Upper Right*) pada kontrol negatif  $(16.18 \pm 1.07\%)$ , kontrol positif  $(10.57 \pm 2.13\%)$  dan senyawa uji 4KM  $(17.02 \pm 1.44\%)$ . Simpulan yang dapat diperoleh pemberian senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat kurang berpotensi sebagai anti agregasi trombosit.

**Kata Kunci:** Asam 2-(4-klorometil benzoiloksi)benzoat, asam asetilsalisilat, agregasi, *thrombocyte aggregation test*, *immuno-flow cytometry*.

## **ABSTACT**

### **EFFECT OF 2-(4-(CHLOROMETHYL))BENZOYLOXY) BENZOIC ACID ON THROMBOCYTE AGGREGATION IN HUMAN PLASMA USING THROMBOCYTE AGGREGATION TEST AND IMMUNO FLOW-CYTOMETRY METHODS**

**FEBRINA FATKIYAH JARRA**  
**2443013324**

Acetylsalicyc acid was a popular analgesic drug and anti trombotic which often given by orally. The purpose of this experiment was evaluated the aggregation of thrombocyte on 2-(4-(Chloromethyl)) Benzoil Oxide Benzoat Acid used human's plasma by Trombocyte Aggregation Test (TAT) and Immuno-Flow Cytometry. The result of this experiment could be use for the development of the novel compound which is more effective and less toxic than aspirin. The experiment was using human's plasma by human's arm which was given treatment by invitro control negative (Hepes 50 mM), control positive (AAS and 50 mM of Hepes) and compound test (Asam2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat and 50 mM of Hepes). The method used the usual concentration acetyl salicyl acid on human such as 50µg/ml (277 µM). The treatment was given by in vitro to PRP which would be given treatment. In Immuno Flow Cytometry such as reactivity antibody on trombocyte and trombocyte aggregation. Immuno-flowcytometry used PE antibody, anti human AP-3 and Alexa antibody, anti human AP-3. Both trombocyte aggregation method were added agonist such as collagen. The result of TAT (vmax) were obtained the average on control negatif ( $0.367 \pm 0.061\%$  detik), control positif ( $0.179 \pm 0.062\%$  detik), and compound test  $0.311 \pm 0.031\%$  detik). The result of immuno-flow cytometry were obtained the average of %total (*Upper Right*) control negativ ( $16.18 \pm 1.07\%$ ), control positif ( $10.57 \pm 2.13\%$ ) and compound test ( $17.02 \pm 1.44\%$ ). The conclusion were obtained that the treatment of 2-(4-(Chloromethyl))benzoil oxide benzoat Acid less potentially as an anti aggregation thrombocyte.

**Keywords:** 2-(4-(Chloromethyl))Benzoil Oxide Benzoat Acid, Acetil Salicylic Acid, thrombocyte aggregation test, immuno-flow cytometry test.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya, sehingga proposal skripsi dengan judul “Pengaruh senyawa asam 2-(4-(klorometil)) benzoiloksi)benzoat terhadap agregasi trombosit dengan metode pengujian *Thrombocyte Aggregation Test* dan *Immuno-flow Cytometry* pada plasma manusia” dapat terselesaikan dengan baik. Penyusunan proposal skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Keberhasilan penulisan skripsi ini tentu tidak terlepas dari bantuan dan dukungan baik secara moral, spiritual dan material dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan penghargaan dengan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan, motivasi, didikan dan bimbingan yang sudah diberikan selama ini, antara lain kepada yang terhormat :

1. dr. Endang Retnowati, MS., Sp.PK(K) selaku pembimbing I dan Yudy Tjahjono, B.Sc., M.Sc.Biol selaku pembimbing II yang telah meluangkan banyak waktu, pikiran dan tenaganya untuk membimbing, mengarahkan dan memotivasi penulis dalam penyelesaian skripsi ini. Catherina Caroline, M.Si., Apt. selaku pimpinan proyek yang telah memberikan nasehat dan dukungan dalam melaksanakan penelitian ini.
2. Dra. Siti Surdijati, MS., Apt selaku penguji I dan Dr. Drh. Hevi Wihadmadyatami, M.Sc selaku penguji II yang telah memberikan kritik dan saran yang berguna untuk menyempurnakan penyusunan skripsi ini.



3. Drs. Kuncoro Foe, G.Dip.Se., Ph.D. selaku Rektor Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
4. Dr. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si. selaku penasihat akademik yang telah banyak memberi nasihat, semangat dan motivasi selama kuliah di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
5. Sumi Wijaya, Ph.D., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi dan Dr. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si selaku Kaprodi S1 Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya yang telah banyak membantu dan memberikan fasilitas dalam proses penyusunan naskah proposal skripsi ini.
6. Seluruh dosen pengajar Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya yang telah mendidik dan memberikan ilmu selama menuntut ilmu di Strata I ini.
7. Kedua orang tua mama (Djurkiah) dan papa (Fathur Rozi) dan keluarga tercinta adik (Zul Armain Fahrezi), mami (Djuhairiyah), om dan tante yang selalu memberikan kasih sayang, semangat, dukungan dan doa sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
8. Erick Nomi Putra yang selalu memberikan kasih sayang, semangat, dukungan dan doa sehingga skripsi ini dapat terselesaikan baik.
9. Teman-teman seperjuangan untuk menyelesaikan naskah proposal skripsi ini Mega, Alfian, Rista, Tya, Elmy, Sam, Rufus.
10. My 8BitterSweet Ella, Sita, Wiwit, Erna, Loviena, Stevany, Intan yang telah mendukung saya selama proses pembuatan naskah proposal skripsi ini.
11. My Best Riwik Bella, Dian, Marisa, Sofyan yang telah mendukung saya selama proses pembuatan naskah proposal skripsi ini.
12. Mybae Daeng dan Siska yang telah mendukung saya selama proses pembuatan naskah proposal skripsi ini.

13. My Stronge Woman Hana, Nurul, Ima, Endang yang telah mendukung saya selama proses pembuatan naskah proposal skripsi ini.
14. Segenap teman-teman Fakultas Farmasi angkatan 2013 yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas kebersamaan dan bantuan yang diberikan.

Penulisan skripsi ini tentunya tidak lepas dari kekurangan karena keterbatasan pengalaman, pengetahuan, dan pustaka. Akhir kata penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk skripsi ini agar dapat disempurnakan.

Surabaya, 10 Agustus 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1    Latar Belakang .....	1
1.2    Rumusan Masalah .....	5
1.3    Tujuan Penelitian .....	5
1.4    Hipotesis Penelitian.....	6
1.5    Manfaat Penelitian .....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1    Asam Asetil Salisilat (AAS) .....	7
2.2    Asam 2-(4-Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat .....	10
2.3    Uji Kemurnian Hasil Sintesis .....	12
2.3.1 <i>Uji Organoleptis</i> .....	13
2.3.2 <i>Uji Titik Leleh</i> .....	13
2.3.3 <i>Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)</i> .....	14
2.4    Trombosit .....	14
2.4.1 <i>Fungsi Trombosit</i> .....	16
2.4.2 <i>Aktivitasi Trombosit secara In Vivo</i> .....	16

	Halaman
2.4.3 <i>Mekanisme Agregasi Trombosit secara In Vitro</i> .....	18
2.5 Anti Trombosit .....	19
2.6 Tinjauan Metode Pengujian .....	22
2.6.1 <i>Tinjauan Uji Agregasi Trombosit (TAT)</i> .....	22
2.6.2 <i>Tinjauan Uji Immuno Flow-cytometry</i> .....	23
2.7 Senyawa Marker Antibodi anti human AP-3 .....	26
BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....	30
3.1 Bahan dan Alat Penelitian .....	30
3.1.1 <i>Bahan Penelitian</i> .....	29
3.1.2 <i>Alat Penelitian</i> .....	30
3.2 Rancangan Metode Penelitian .....	32
3.2.1 <i>Sintesis Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi Benzoat)</i> .....	33
3.2.3 <i>Perlakuan pada Plasma Subyek secara In Vitro</i> .....	34
3.2.4 <i>Prosedur Isolasi Darah dan Pembuatan PRP</i> .....	35
3.2.5 <i>Prosedur Uji Agregasi Trombosit (TAT)</i> .....	36
3.2.6 <i>Prosedur Uji Immuno-Flowcytometry</i> .....	37
3.3 Analisis Statistika.....	45
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	46
4.1 Hasil Pemeriksaan Organoleptis .....	46
4.2 Hasil Uji Kemurnian Senyawa .....	46
4.2.1 <i>Hasil Uji Senyawa Titik Leleh</i> .....	46
4.2.2 <i>Hasil Uji Senyawa Kromatografi Lapis Tipis (KLT)</i> .....	47

	Halaman
4.3 Hasil Uji <i>Thromboocyte Aggregation Test</i> (TAT).....	49
4.4 Hasil Uji <i>Immuno-Flowcytometry</i> .....	53
4.4.1 Uji Reaktivitas Antibodi .....	53
4.4.2 Pengamatan Anti Agregasi Trombosit .....	55
4.5 Pembahasan .....	58
4.5.1 Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi Benzoat) Murni Menurut Pengamatan Uji Titik Leleh dan KLT .....	58
4.5.2 Pentingnya Penggunaan Buffer Fisiologis Hepes Pada Seluruh Pengujian .....	59
4.5.3 Penggunaan Konsentrasi 50µg/ml dan Agonis Kolagen dengan Konsentrasi 5 µg/ml untuk Mengaktivasi Agregasi Trombosit .....	59
4.5.4 Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi Benzoat) Kurang Berpotensi Dalam Mengaktivasi Trombosit Dengan Metode <i>Trombocyte Aggregation Test</i> Menggunakan Plasma Manusia .....	60
4.5.5 Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi Benzoat) Kurang Berpotensi Dalam Mengaktivasi Trombosit Dengan Metode <i>Immuno Flow-cytometry</i> Menggunakan Plasma Manusia .....	61
4.5.6 Antibodi Anti Human AP-3 Adalah Marker Spesifik Terhadap Trombosit .....	61
4.5.7 Gating Populasi Trombosit .....	62
4.5.8 Penggunaan Double Stainy R-Phycoerythrin PE F(Ab') <sub>1</sub> Goat-Anti Mouse igG (H+L) dan Alexa Flour 488-Murine anti human Fc IgG Dalam Uji Agregasi Trombosit Menggunakan Metode <i>Immuno-Flowcytometry</i> .....	62

	Halaman
4.5.9 <i>Perbedaan Hipotesis Bahwa Senyawa Asam 2-(4-Klorometil Benzoiloksi) Benzoat Sebagai Prodrug</i> .....	63
4.5.10 <i>Peran Senyawa Asam 2-(4-Klorometil Benzoiloksi) Benzoat Terhadap COX-1 dan COX-2</i> .....	63
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	62
5.1 Kesimpulan.....	62
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA .....	63
LAMPIRAN .....	76

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur yang menggambarkan molekul AAS.....	7
2.2 Mekanisme Kerja AAS.....	9
2.3 Struktur Asam 2-(4-Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat.....	10
2.4 Struktur Trombosit .....	16
2.5 Mekanisme Agregasi Trombosit dengan Agonis Kolagen secara <i>In Vivo</i> .....	17
2.6 Mekanisme Agregasi Trombosit dengan Agonis Kolagen secara <i>In Vitro</i> .....	19
2.7 Mekanisme kerja AAS pada Trombosit .....	20
2.8 Nilai v <sub>max</sub> .....	23
2.9 Uji Agregasi Trombosit .....	24
2.10 Ilustrasi Agregasi Trombosit pada <i>Immuno-Flow Cytometry (In Vitro)</i> .....	28
3.1 Skema Rancangan Penelitian.....	32
3.2 Skema Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test</i> (TAT) .....	35
3.3 Uji Reaktivitas Pada Trombosit.....	40
3.4 Uji Agregasi Trombosit .....	43
4.1 Pengamatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	49
4.2 Hasil Grafik Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test</i> (TAT) .....	50
4.3 Pola Hasil V <sub>max</sub> Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test</i> (TAT)	52
4.4 Pola Hasil % <sub>max</sub> Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test</i> (TAT)	53
4.5 <i>Gating</i> Populasi Trombosit.....	54
4.6 Uji Reaktivitas Antibodi Terhadap Trombosit .....	55
4.7 Uji Anti Agregasi Trombosit.....	59
4.8 Uji <i>Immuno-flow Cytometry</i> .....	60

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Fluorokrom yang umum digunakan dalam Analisis .....	25
3.1 Bahan Penelitian yang digunakan.....	29
3.2 Alat Penelitian yang digunakan .....	30
4.1 Pemeriksaan Organoleptis .....	46
4.2 Titik Leleh Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi) Benzoat.....	47
4.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis Senyawa 2-(4-(Klorometil)Benziloksi)Benzoat .....	48



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A Hasil Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test (TAT)</i> .....	71
B Hasil Uji <i>Immuno-Flow Cytometry</i> .....	72
C Rangkuman Hasil Uji <i>Immuno-Flow Cytometry</i> .....	75
D Rangkuman Hasil <i>Thrombochyte Agregation Test (TAT)</i> .....	76
E Surat Kelayakan Etik.....	79
F Surat Pernyataan Subjek ( <i>Informed Consent</i> ) .....	80

## DAFTAR SINGKATAN

AA	= Arachidonic acid
AAS	= Asam Asetilsalisilat
AC	= Enzim adenilen siklase reseptor platina TXA <sub>2</sub>
ADP	= Adenosin difosfat
ATP	= Adenosin trifosfat
COX	= Cyclooxygenase
DTS	= Dense tubular system
ED <sub>50</sub>	= <i>Effective dose 50</i>
FSC	= Forward scatter
GP	= Glikoprotein
KLT	= Kromatografi lapis tipis
LD <sub>50</sub>	= Lethal dose 50
Mit	= <i>Mitochondria</i>
MTC	= Mikrotubular coil
OAINS	= Obat anti inflamasi non steroid
OCS	= <i>Open canalicular system</i>
PE	= Phycoerythrin
PG	= Prostaglandin
PGD <sub>2</sub>	= Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	= Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub> $\alpha$	= Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$
PGH <sub>2</sub>	= Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	= Prostaglandin I <sub>2</sub>
PLT	= Platelet
PPP	= <i>Platelet poor plasma</i>
PRP	= <i>Platelet rich plasma</i>

Rf	= Retardation factor
SSC	= Side scatter
TAT	= Thrombocyte aggregation test
TP	= Reseptor platinum PGI <sub>2</sub> (reseptor IP)
TXA <sub>2</sub>	= Tromboksan A <sub>2</sub>
VSMCs	= Vascular smooth muscle zzzcells
v/v	= Volume per volume
vWf	= Von willebrand factor
$\alpha$ -G	= $\alpha$ -granules
$\delta$ -G	= $\delta$ - <i>granules</i> atau <i>dense bodies</i>
4KM	= Asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat